

Szervetlen gyógyszerhordozó nanorészecskék előállítása és jellemzése

NAGYNÉ NASZÁLYI Livia^{a,*}, PÁLMAI Marcell^a, PETHŐ Adrienn^a, CSÁSZÁR Barbara^a, POLYÁK András^b, SZIGYÁRTÓ Imola Csilla^a, MIHÁLY Judith^a, WACHA András^a, LŐRINCZ András^a, SZÉCSÉNYI Ágnes^a, DEBRECZENI Balázs^a, BALOGH Lajos^b és BÓTA Attila^a

^aMagyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezetkémia Intézet, Biológiai Nanokémia Osztály, Magyar Tudósok krt. 2., 1117 Budapest, Magyarország

^bOrszágos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet, Izotóp-alkalmazási és Állatkísérletes Osztály, Anna u. 5., 1221 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Szervetlen gyógyszerhordozó rendszerek használata olyan esetekben indokolt, amikor a hatóanyag bejuttatása hordozó nélkül, illetve más típusú hordozóval nem lehetséges vagy nem elég hatékony.^{1,2} A leggyakoribb ok a hordozó használatára a hatóanyag rossz oldhatósága vízben. A gyógyszerhordozóval szemben támasztott legfontosabb követelmények az uniformitás (megfelelően szűk méreteloszlás), a biológiai közegben megőrzött kolloid-stabilitás (rövid időtávon: injektálás, keringés), a mindig azonos forma és felület, a biokompatibilitás és a biodegradabilitás (hosszú időtávon). További előnyt jelent, ha a hordozó a véráramban keringve aktívan megcélazza a beteg szövetet, jelenléte pedig nem-invazív képalkotási technikákkal kimutatható.³

Szilika nanorészecskék gyógyszerhordozóként való alkalmazására jelentős számú kutatás folyik.⁴⁻⁷ A szilika nanorészecskék mérete-alakja jól szabályozható a szintézis során, felületük pedig a felhasználó igénye szerint sokféleképpen módosítható. A többfunkciós felületeken helyet kaphatnak célzó egységek (pl. fehérjék), jelzőanyagok, ill. a hatóanyag. Nagyobb gyógyszer / hordozó arány érhető el mezopórusos szilikák alkalmazásával, mivel a hordozó üregei is megtöltődnek hatóanyaggal.

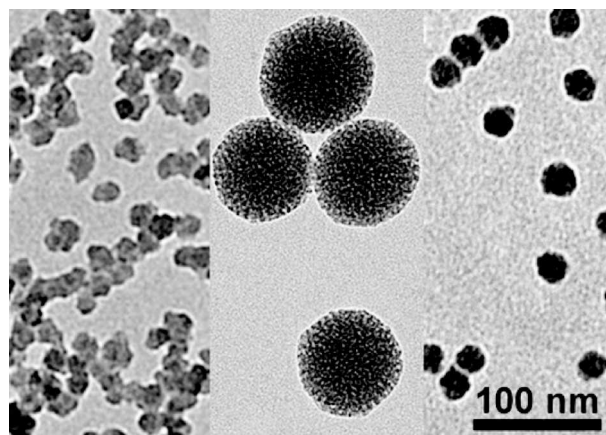
A cirkónium-dioxid a gyógyászatban már elterjedt anyag: alkalmazzák implantátumok bevonataként, mert bioaktivitásával segíti annak beépülését, valamint fogászati tömő és fogpótló anyagként.^{8,9} Gyógyszerhordozóként való alkalmazhatóságára csupán néhány megjelent cikk utal.¹⁰⁻¹² ZrO₂ nanorészecskék szintézisére nincsenek olyan általánosan elfogadott, könnyen reprodukálható eljárások, mint a szilika esetében. Leírták azonban a szilika és a cirkónium-dioxid, mint mag@héj szerkezetű nanorészecskék ill. kevert oxidok előállítását.^{13,14}

Kutatócsoportunk 2009-es megalakulása óta szenzor- és gyógyszerhordozók előállításával és jellemzésével foglalkozik. Ebben a közleményben a szervetlen alapú: szilika, cirkónium-dioxid és a kettő ötvöztetésével nyert részecskékkel elért eredményekről számolunk be.

2. Szilika nanorészecskék

Csoportunk többféle célra készít szilika nanorészecskéket: többfunkciós hordozónak, gyógyszerhordozónak és metrológiai vizsgálatokra alkalmas referencia-anyagnak.

Többfunkciós hordozónak kb. 20 nm átmérőjű, jól módosítható felületű Stöber szilikát alkalmaztunk¹⁵ (1. ábra baloldalon). Gyógyszerhordozáshoz 85 nm átmérőjű, porózus részecskéket készítettünk Yu eljárásával¹⁶ (1. ábra középen). Metrológiai standardnak nagyon jól szabályozott alakú és szűk méreteloszlású részecskéket készítettünk Hartlen módszerével¹⁷ (1. ábra jobboldalon).



1. Ábra. Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételek 20 nm átmérőjű Stöber (bal oldalon), 85 nm átmérőjű porózus Yu (középen), ill. 20 nm átmérőjű Hartlen (jobb oldalon) szilika nanorészecskékről.

A kisszőgű röntgenszórásos (SAXS) mérési eredmények monodiszperz jellegű nanorészecskékre utalnak, ugyanis a lecsengő szórási görbéken megjelenő hullámalakú karakterisztikus forma csak az igen szűk méreteloszlású és szabályos alakú részecskéket tartalmazó mintáknál jelentkezik.¹⁸ A Hartlen és Yu módszerével készített minták nagyobb uniformitást mutatnak, mint a Stöber részecskék.

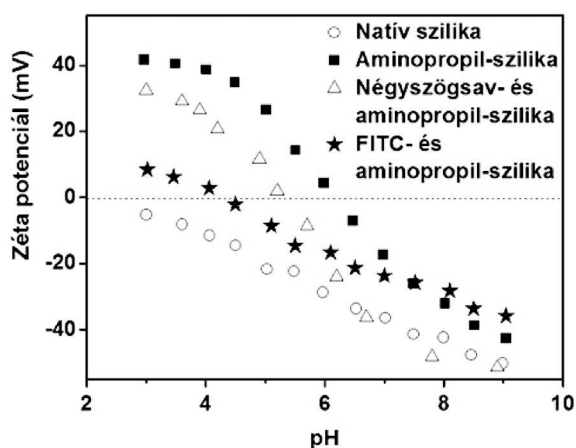
2.1. Többfunkciós hordozó részecskék

Többfunkciós hordozó részecskéket a felület többszörös funkcionálisálásával alakítottunk ki. Elsőként aminopropil-láncok kovalens kötését végeztük általunk kidolgozott, környezet és szervezetbarát eljárással.¹⁹ Ezután az amino-

* Tel.: +36-1-382-6832; e-mail: nagy.naszalyi.livia@ttk.mta.hu

csoportok egy részét tovább reagáltattuk többféle módon.²⁰ Fluorescein-izotiocianát (FITC) felkapcsolásával fluoreszcens bifunkciós hordozót állítottunk elő. Szulfoszukcinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciklohexán-1-karboxilát felkapcsolásával az amino-csoportok egy kis részén fehérjekötő funkciót alakítottunk ki (tiol-kötő). Négyszőgsav, ill. észterei felkapcsolásával fiziológias pH-n könnyen tovább módosítható és nem toxikus bifunkciós hordozót nyertük (amino-kötő).

A felületmódosításokat Fourier-transzformációs infravörös (FTIR), valamint UV-látható spektroszkópiával követtük nyomon, a felület kovalens módosítását zéta-potenciál – pH mérésekkel igazoltuk (2. ábra).



2. Ábra. Zéta potenciál – pH függvények natív, aminopropil- és bifunkciós szilikákon.

CellTiterGlo® assay során az aminopropil- és négyszőgsav-felületű bifunkciós szilika részecskék 48 óra alatt csak 0,33 mg/ml, 120 óra inkubációs idő mellett pedig 0,04 mg/ml koncentráció felett mutattak toxicitást. Sejtfelvételi vizsgálat szerint az aminopropil- és FITC- felületű bifunkciós szilikák (0,5mg/ml) 4 óra inkubálás alatt bejutnak az általunk vizsgált H358 sejtekbe és fluoreszcensen jelölik azokat.

2.2. Gyógyszerhordozó részecskék

Porózus szilika hordozókat állítottunk elő Yu módszerével gyógyszerhordozásra.¹⁶ Azt találtuk azonban, hogy az irodalomban közölt eljárással nem mezopórusos, hanem mikropórusos minták nyerhetők, bár a cikkben mezopórusokról számoltak be (minta jele: MSN1). Ezen lényegében nem változtatott a cikkben leírt lúgos hidrotermális kezelés sem (minta jele: MSN4). N₂ adszorpció-deszorpció izoterma tanúsága szerint a pórusok átmérője MSN1 mintában 1,6±0,4 nm. SAXS módszerrel pedig meghatároztuk a részecskékben az elsősomszéd-pórustávolságot (két közvetlen egymás mellett lévő pórus középpontjának távolsága), amely az MSN1 minták esetében 7,17±0,02 nm.

Különböző hatóanyagok adszorpcióját végeztük el MSN1 részecskéken: daunorubicin, urzolsav (UA) és DL- α -difluorometil-ornitin (DFMO) rákellenes szereket. Termogravimetriás vizsgálatokkal a következő hatóanyag-tartalmakat állapítottuk meg: 1,5 % urzolsav, 3,5 % daunorubicin és 6,5% DFMO (az értékek a hordozó tömegére

vonatkozó m/m%-ok). A 25°C-on Millipore vízben (pH 6) végzett kioldódási vizsgálatok szerint a daunorubicin 72%-a (25 μ g/mg hordozó) elhagyja a hordozót a kioldódás első órájában az UV-látható spektrumok alapján (250 rpm kevertetés mellett). A maradék 28% (9,8 μ g/mg) a következő 3 nap alatt ürül ki fokozatosan. Urzolsav esetén félkvantitatív kiértékelést végeztünk FTIR spektrumok sáv alatti területeinek integrálásával. Eszerint kb. 40% hatóanyag (6 μ g/mg) hagyja el a hordozót az első egy órában, a többi pedig (9 μ g/mg) elnyújtva oldódik ki nagyjából 4 nap alatt. Az DFMO kioldódása, amelyet HPLC-MS módszerrel határoztunk meg, az előzőeknél sokkal gyorsabb: 99%-a a betöltött hatóanyagának kiürül 2 órán belül (lásd részletesen a 4.2. fejezetben, 10. ábra).

Doxorubicin (DOX) hatóanyag esetében megvizsgáltuk, hogy azonos-e a betölthető hatóanyag mennyisége előzetes felületmódosítás esetén is. Mivel a legtöbb felületmódosítás az aminálási lépéssel kezdődik, az aminopropil-szilika tölthetőségét hasonlítottuk a natív szilikáéhoz. A betöltés eredménye 17,5 m/m% doxorubicin volt mind natív, mind pedig aminopropil-felületű szilikára nézve.

2.3. Metrológiai standard részecskék

Metrológiai módszerek kidolgozásához és alkalmazásához szükség van adott méretű és alakú, szűk méreteloszlású részecskék előállítására. A „field-flow fractionation” elválasztást követő induktív csatolású plazma-tömegspektrometria (FFF-ICP-MS) módszerével minta-előkészítés nélkül lehet méret szerint elválasztani, és frakciónként analizálni az összetett rendszereket. Ennek egy újabb változata az izotóp-hígításos tömegspektrometria (isotope dilution mass spectrometry, IDMS), amelynek során a mennyiségi meghatározást a mintához adott, a mintában megtalálható részecskéhez hasonló, de izotóparányban különböző belső standard teszi lehetővé.

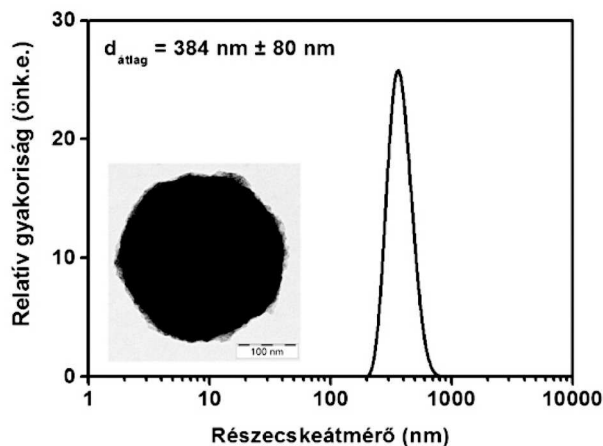
Az IDMS kivitelezésére ²⁹Si-tetraetil-ortoszilikát (²⁹Si-TEOS) totálszintézisét dolgoztuk ki (szilícium-29 porból kiindulva), majd az izotópdúsított reagensből kiindulva a természetes izotóparányú szilikához mindenben hasonló 20 nm átmérőjű részecskéket állítottunk elő Hartlen eljárásával.^{21,22}

3. Cirkónium-dioxid részecskék

Cirkónium-dioxid részecskék hordozóként való alkalmazásakor azt a célt tűztük ki, hogy egyetlen szintetikus lépéssel porózus és fluoreszcens hordozót kapjunk, amely alkalmas hatóanyag molekulák megkötésére a felületén. Widoniak és munkatársai módszerére alapozva 300-400 nm közötti átlagos átmérővel rendelkező ZrO₂ részecskéket állítottunk elő²³ (3. ábra).

Megállapítottuk, hogy templát molekula (cetil-trimetil-ammónium-bromid, CTAB) jelenlétében végzett szintézissel csak vizes közegben keletkeznek mezopórusok a részecskékben, ugyanakkor az így kapott anyag nem nanorészecskékből áll, hanem szabálytalan 1 μ m feletti átmérőjű részecskék összetapadt halmazaként. Kétfázisú röntgenszórás vizsgálatok alapján az irodalmi szintézissel nyert ZrO₂ részecskék pórusosak. A megfigyelt 1,76±0,15

nm ekvivalens gömbátmérőjű pórusok a mikropórusok tartományába esnek. A N_2 adszorpciós-deszorpciós kísérlet a SAXS-sal jó egyezéssel $1,5 \pm 0,4$ nm átmérőjű pórusokat mutatott ki.



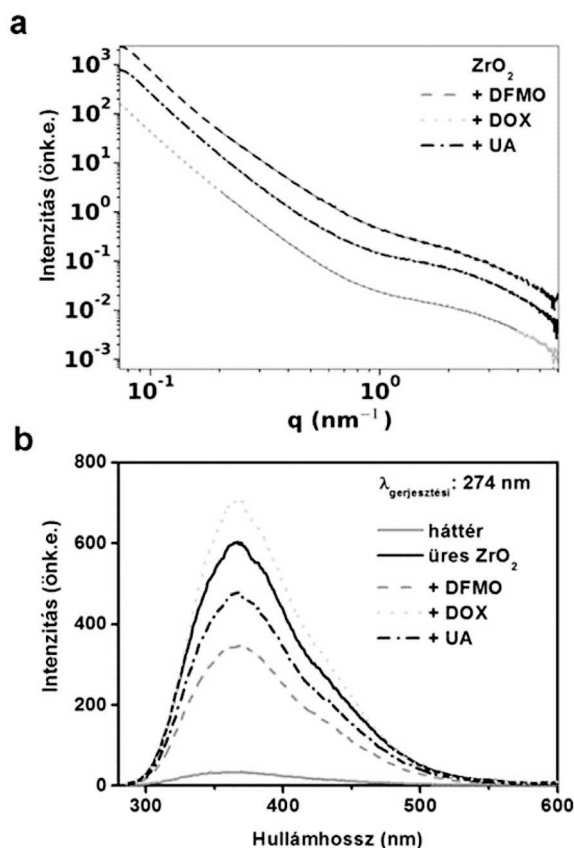
3. Ábra. ZrO_2 részecskék dinamikus fényszórás mérésből kapott méreteloszlás függvénye és transzmissziós elektronmikroszkóp felvétele.

Irodalomban lantanoida dópólással készítették fluoreszcens cirkónium-dioxidot,^{24–27} egy közlemény szerint pedig CTAB templát kiégetése utáni szerves maradék indukál fluoreszcenciát ZrO_2 -ban.²⁸ A mi kísérleteink során prazeodímium(III) lantanoida dópolás hatására nem képződtek gömb alakú részecskék. Ez részben a magasabb vegyértékű ion hatása a kontrollált hidrolízis-kondenzáció reakcióssora, részben a klorid ellenionok savasító hatásának következménye lehet. CTAB mellett előállított ZrO_2 por égetés után kapott fluoreszcenciáját összehasonlítva a templát nélkül készített szolélval, azt tapasztaltuk, hogy azonos hullámhosszon jóval intenzívebb fluoreszcenciát biztosít a templát nélküli minta. A CTAB használata tehát nem indokolt.

Megvizsgáltuk 3 hatóanyag-molekula adszorpcióját a Widoniak-féle fluoreszcens és mikropórusos ZrO_2 felületén (DFMO, DOX és UA).²⁹ Termogravimetriásan igazoltuk az adszorpció sikerességét. A megkötött hatóanyag mennyisége (a szilikán végzett kísérlettel ellenkezőleg) a DFMO-tól az urzolsavig nőtt: DFMO 0,65 m/m%, DOX 1,75 m/m% és UA 2,6 m/m%. A hatóanyag-adszorpció hatására a pórusméret kismértékű csökkenését, és a fluoreszcencia intenzitásának 20%-on belüli megváltozását tapasztaltuk (4. ábra).

Vizsgálataink kimutatták, hogy az UA adszorpció következtében a ZrO_2 részecskék izoelektromos pontja jelentősen eltolódik (pH 7,1-ről 5,8-ra). Ezáltal a részecskék fiziológiás környezetben töltéssel rendelkeznek, megőrzik stabilitásukat, így lehetőség nyílik *in vivo* alkalmazásukra.

A stabilitás megőrzésének tesztelésére fiziológiás sóoldatot tartalmazó foszfát pufferben fényszórás-vizsgálatokat végeztünk. Miután megbizonyosodtunk a stabilitásról, a részecskéket technécium-99m (^{99m}Tc) izotóppal jeleztük, majd normál szervezetszervi vizsgálatokat végeztünk egészséges kutyán SPECT/CT segítségével. Ezek során bizonyossá vált, hogy a részecskék jó hatásfokkal (~99%) jelezhetők az izotóppal, és sem a jelzés során, sem az injektlás hatására nem veszítik el kolloid-stabilitásukat.²⁹



4. Ábra. Hatóanyaggal töltött ZrO_2 részecskék SAXS görbéje és a kiértékelés során illesztett függvények (folytonos vonalak) (a), valamint az azonos töménységű szolok fluoreszcencia spektruma (b).

4. Szilika@cirkónium-dioxid mag@héj nanorészecskék

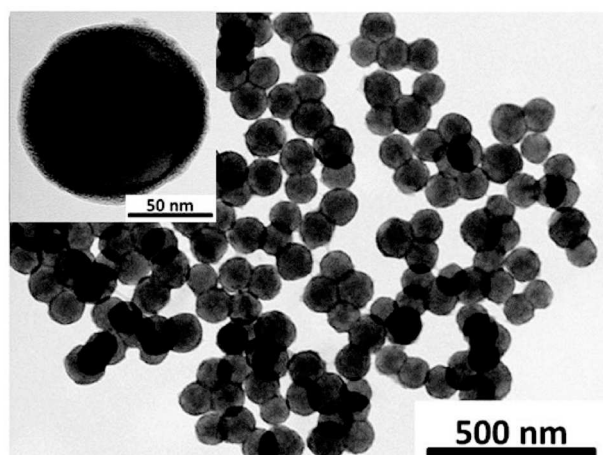
Hatóanyag-hordozó rendszer esetében feltétlenül szükséges a 200 nm alatti átmérő biztosítása. Ez ZrO_2 esetében nem volt lehetséges. Emiatt további munkánk során szilika templát felületére választottunk le cirkónium-dioxidot és így nyertünk 100-150 nm közötti méretű hordozókat. Az irodalom szerint ez a méret segíti elő leginkább a daganatban való passzív dúsulást.³⁰ A cirkónium-dioxid felülete katalitikus aktivitást mutat észter-képzésben,³¹ és megfigyelésünk szerint eközben maga a katalizátor felület is észterrel borítódik be. Ezt a jelenséget használtuk ki komplex hordozóink készítésére.

4.1. $SiO_2@ZrO_2@PMA$ nanoteranosztikum

Az itt bemutatott munkánk során folát receptort overexpresszáló daganat-típusokat célzó teranosztikus nanorészecske kifejlesztése volt a cél. Tömör Stöber szilika magra választottunk le cirkónium-dioxid héjat Kim és társai módszerének felhasználásával.¹³ Így egy vékony, egy-kristallit vastagságú ZrO_2 réteget kaptunk a megfelelő méretű szilika felületén, amelyre azután almasav-alapú összetett polimer réteget (PMA) választottunk le egy lépéses polikondenzációval. A polimer réteg további alkotói β -ciklodextrin, folsav és két végén amino funkciós csoporttal ellátott polietilén-glikol láncok voltak.³²

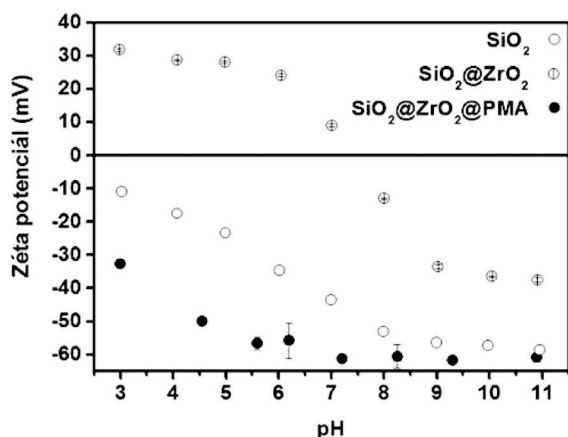
A 100 nm átlagos átmérőjű Stöber szilika magra felépített komplex nanorészecskék átlagos átmérője kb. 130 nm. A

TEM felvételeken látszik, hogy a polimer bevonat folytonos (5. ábra).



5. Ábra. $\text{SiO}_2@\text{ZrO}_2@\text{PMA}$ nanorészecskék transzmissziós elektronmikroszkóp felvételei.

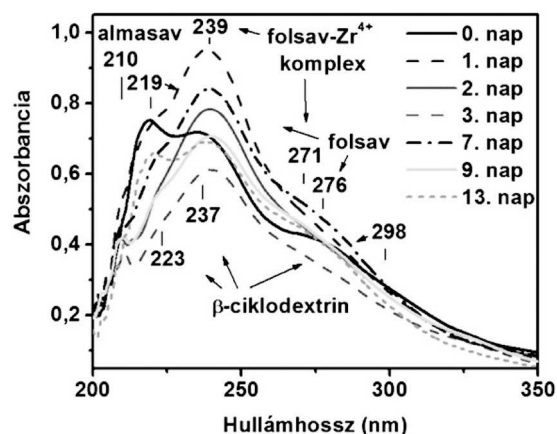
A részecskék felépülése együtt jár a felületi töltés megváltozásával, amit a pH függvényében mért zéta potenciál függvényekkel mutatunk be (6. ábra).



6. Ábra. Zéta potenciál – pH függvények SiO_2 , (üres kör), $\text{SiO}_2@\text{ZrO}_2$ (áthúzott kör) és $\text{SiO}_2@\text{ZrO}_2@\text{PMA}$ (teli kör) nanorészecskék szuszpenziójáról.

A natív szilika pH 2-nél lévő izoelektromos pontja a ZrO_2 leválasztásakor pH 7,5-re tolódik (tisztá cirkónium-dioxidra jellemző érték).^{33,34} A felület jellege ismét megváltozik az almasav-alapú polimer leválasztása után: a zéta potenciál -60 és -30 mV között mozog. Ez alapján a részecskék szuszpenziója kinetikai stabilitást mutathatna a teljes pH tartományban. A karbonsavakra jellemző ikerionos szerkezet-kialakítás azonban destabilizációt eredményez pH 7 alatt. 10 mM foszfát pufferben (pH 7,5) felvett részecskék (0,5 mg/ml) már megfelelő stabilitással rendelkeznek a biológiai felhasználáshoz: a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -jelzést követő 1 hét alatt sem változik meg a méreteloszlásuk.

A hordozó fiziológiás sóoldatban történő bomlását vizsgálva 25°C-on megállapítottuk, hogy a naponta cserélt felülúszó változó összetételben tartalmazta a polimer-alkotókat: almasavat, β -ciklodextrint, folsavat és PEG-láncot (FTIR, UV-vis és HPLC-MS vizsgálatok) (7. ábra).



7. Ábra. $\text{SiO}_2@\text{ZrO}_2@\text{PMA}$ nanorészecskék bomlás-vizsgálata során kapott felülúszók vizsgálata UV-látható spektroszkópiával.

További UV-látható spektroszkópiás vizsgálattal megállapítottuk, hogy a kioldódási felülúszókban 239 nm-nél tapasztalt elnyelési sáv, amelynek megjelenése az eredeti polimer-alkotókkal nem magyarázható, a folsavnak a cirkónium ionokkal alkotott komplexéhez rendelhető. A kioldódási maradék FTIR vizsgálatával pedig egyértelműen megállapítható, hogy a szilika mag feloldódása is megkezdődött a kéthetes bomlásvizsgálat alatt.

Toxicitás-vizsgálatot végeztünk CytoToxFluor™ assay alkalmazásával humán Jurkat sejteken. A vizsgálatot 0,025–500 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú nanohordozó jelenlétében 3 különböző inkubációs idő (24, 48 és 72 óra) után végeztük el három-három párhuzamos mintán. Sem koncentráció-, sem időfüggő toxicitás nem volt megfigyelhető.

A 10 mM foszfát pufferben (pH 7,5) felvett $\text{SiO}_2@\text{ZrO}_2@\text{PMA}$ hordozó $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -jelzése 99%-os hatásfokkal elvégezhető a pertechnetát ón-kloridos redukciója mellett. *In vivo* SPECT/CT szervezetszlás-vizsgálat készült három him Fischer 344 patkányon, amelyekbe előzőleg 5×10^6 db folát receptort overexpresszáló hepatokarcinóma sejt került beültetésre. A szervekben mérhető aktivitás az injektlást követően 30 perc, 3 óra és 20 óra elteltével lett mérve. Az injektlált nanoteranosztikum közel fele a májban halmozódott fel, amint azt korábban hasonló méretű hordozó esetében megfigyelték.³⁵ A kiválasztó szerv mellett azonban a legmagasabb aktivitás a daganatban mutatkozott: az injektlált dózis 5–11%-a. Ez az aktivitás elegendő a daganatok megfelelő azonosításához és detektálásához.

Valós klinikai vizsgálatot modellezve folsav-overexpresszáló orrüregi karcinómában szenvedő, spontán daganatos macskát vizsgáltunk humán SPECT/CT készüléken.³⁶ A fúziós SPECT/CT képek kiegészítő adatként tekinthetők meg, elektronikus formában.

A kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a komplex, szervetlen magra leválasztott polimer részecske diagnosztikai célra alkalmas. Hatóanyag nélkül is lehet vele folsav-túltermelő daganatot diagnosztizálni és lokálisan sugárkezelni. A hordozó további előnye, hogy a polimer héjban található β -ciklodextrin egységekkel várhatóan a hordozó fizikai-kémiai tulajdonságainak jelentős megváltoztatása nélkül lehet utólagos hatóanyag-betöltést

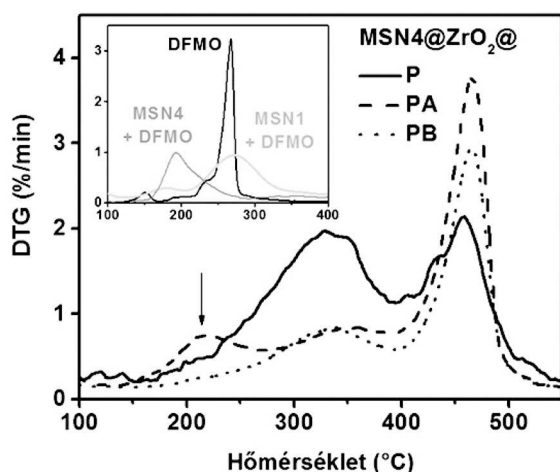
végezni, és így a tumornak leginkább megfelelő, egyedre (személyre) szabott terápiát végezni.

4.2. MSN@ZrO₂@P gyógyszerhordozók

Tömör Stöber szilika mag esetében a hordozó nagy része csupán passzív szerepet játszik a hatóanyag-hordozásban. A betölthető hatóanyag mennyiségének növelése érdekében mezopórusos szilika középpontú komplex gyógyszerhordozót szándékoztunk előállítani. A kiválasztott hatóanyag a DFMO volt, mivel jelentős mennyiségben adszorbeálódott szilika felületén. Ez a vízoldható kismolekula alacsony toxicitása és bizonyított rákellenes hatása ellenére sincs jelenleg klinikai használatban. Ennek egyik oka az, hogy cseppinfúzióban kell adagolni a betegeknek a gyors kiürülése miatt, és ez ágyhoz köti a pácienseket. Újbóli bevezetéséhez elnyújtott hatóanyag-leadást kell megvalósítani, valamint minél nagyobb lokális dózist. Erre a célra kívántunk gyógyszerhordozót kifejleszteni.

85 nm átmérőjű Yu szilika nanorészecskéket készítettünk (MSN1), és elvégeztük rajtuk az irodalom szerint a „pórusok méretét növelő” lúgos hidrotermális kezelést (MSN4).¹⁶ Az így kapott kétféle szilika magra ZrO₂ réteget választottunk le az irodalmi módszer további módosításával (MSN1@ZrO₂, ill. MSN4@ZrO₂).^{13,37} Polimer réteg leválasztásához almasavat és DFMO-t mértük a hordozóhoz, és azokat polikondenzációs reakcióban reagáltattuk. Attól függően, hogy a DFMO-t a ZrO₂ leválasztása előtt vagy után adtuk a hordozókhöz, létrehoztunk MSN@ZrO₂@PA és MSN@ZrO₂@PB jelű mintákat mindkét magon (MSN1, MSN4).

A TEM felvételek tanúsága szerint a lúggal kezelt MSN4 középpontú komplex hordozók felülete egyenetlenebb módon tartalmazza a polimer réteget, mint az MSN1 középpontú változat.

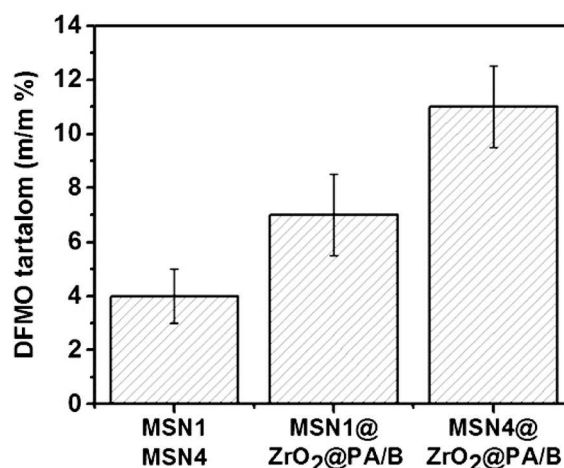


8. Ábra. Differenciális termogravimetriás görbék a DFMO-t nem tartalmazó (MSN4@ZrO₂@P), illetve a ZrO₂ leválasztása előtt (MSN4@ZrO₂@PA) és utána (MSN4@ZrO₂@PB) DFMO-val töltött nanohordozókon. A kis ábrán a DFMO differenciális bomlási görbéje látható fekete színnel, valamint a kezeletlen (MSN1) és lúgosan kezelt (MSN4) szilikákba töltött DFMO DTG görbéi szürke színnel.

Termogravimetriás méréssel hibahatáron belül azonos mennyiségű (5-9%) DFMO volt kimutatható mindkét bevonat nélküli szilika mintán (MSN1 és MSN4). Ezt a pikrilszulfonsavval végzett kolorimetriás teszt is

megerősítette, noha alacsonyabb átlagértéket mutatott (4%). A DTG görbék tanúsága szerint azonban különbség van a hatóanyag megkötésének módja között, mivel az MSN4 minta esetében a tiszta DFMO bomlási hőmérsékleténél alacsonyabb hőmérsékleten figyelhetünk meg tömegvesztést, mintha azt a megváltoztatott (aktivált) szilika felület katalizálná (kis kép a 8. ábrán). A DTG görbék tanúsága szerint ez a különbség a polimerreteg leválasztását követően is megmarad (lásd a nyíllal jelzett bomlási csúcsot MSN4@ZrO₂@PA mintánál, 8. ábra).

Vizsgáltuk azt is, hogy eltömődnek-e a pórusok a ZrO₂ leválasztás következtében. Metilénkék (tesztmolekula) adszorpciója jelentősen lecsökkent a ZrO₂ leválasztás után mind az MSN1, mind pedig MSN4 mintán. Eszerint a metilénkék számára hozzáférhetetlenek lesznek a pórusok a leválasztás hatására. A hordozókat sósavas emésztést követően pikrilszulfonsavval reagáltatva kolorimetriásan meghatároztuk a komplex hordozókba zárt DFMO teljes mennyiségét (9. ábra).

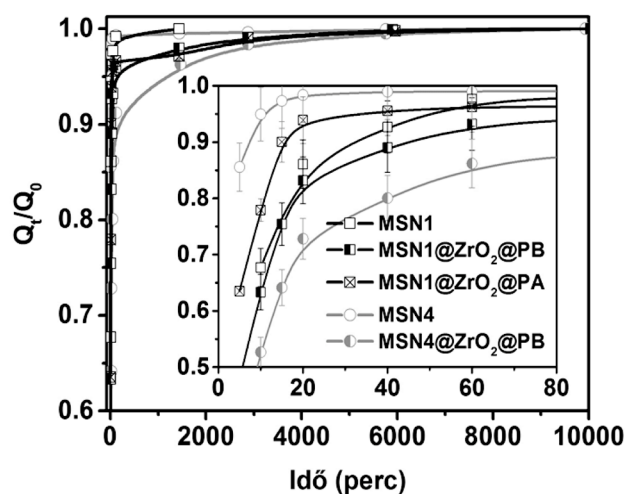


9. Ábra. Hatóanyag tartalom mennyiségi meghatározása sósavas emésztést követő pikrilszulfonsav tesztel mezopórusos szilika (bal oszlop), ill. lúgos utókezelés nélkül (középső oszlop) és lúgos utókezelés után (jobb oszlop) készített komplex gyógyszerhordozó nanorészecskéken.

Eszerint a lúgos kezelés jelentősen befolyásolta a komplex hordozókban megkötött DFMO mennyiségét. Mivel a pórusok mérete valójában nem változik, így azt feltételezzük, hogy az aktívabbá vált szilika felületre leválasztott nagyobb mennyiségű cirkónium-dioxid az, ami hatékonyabban katalizál: magasabb konverziójú polimer réteget alakít ki a részecskék felületén, amely így több hatóanyagot zár magába (a konverzió növekedése egyértelműen megfigyelhető a DTG görbékben, de itt az MSN1 hordozókról készült felvételeket a jobb átláthatóság kedvéért nem mutatjuk be).

Hatóanyag-kioldódási vizsgálatokat végeztünk HPLC-MS meghatározással annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, sikerült-e elnyújtottabbá tenni a hatóanyag leadását a komplex hordozókkal (10. ábra). A kioldódási görbék ábrázolásakor az adott ideig kioldódott DFMO mennyiségét (Q) osztottuk a 10000. percig kioldódott (teljes) mennyiséggel (Q₀) a görbék összehasonlíthatóságáért. Az üres szimbólumokkal jelölt, bevonat nélküli hordozókból az első két órában távozik a betöltött hatóanyag 99%-a. Ez a mennyiség 96%-ra csökken az MSN1 közepű komplex hordozóknál. További javulást

értünk el MSN4 közepű komplex mintán (93% kioldódás az első két óra alatt).



10. Ábra. Normált hatóanyag –kioldódás profilok a bevonat nélküli és a komplex bevonattal ellátott gyógyszerhordozó részecskékből.

Az utóbbi mintába ugyanakkor háromszor annyi hatóanyag lett betöltve, mint a bevonat nélküli szilikába. Így két óra után az MSN4@ZrO₂@PB minta még 7,7 µg/mg DFMO-t tartalmaz, amely további 2 nap alatt oldódik ki, szemben a natív szilikákkal, amelyekben már csupán 0,4 µg/mg van ekkor. Célunkat tehát elértük. További terveink között szerepel a hordozók terápiás hatékonyságának bizonyítása.

5. Összefoglalás

Változatos funkciókkal ellátott szilika, ZrO₂ és komplex szilika@ZrO₂@polimer hordozókat állítottunk elő különböző orvosbiológiai célra. Anyagaink fizikai-kémiai jellemzése és toxicitás-vizsgálata a hatóanyag-hordozók alkalmazásához nélkülözhetetlen információval szolgál. További terveink között szerepel nagy porozitású, ill. üreges hordozók készítése, illetve további szervetlen-szerves komplex hordozók kidolgozása.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük az analízisek elvégzését Kiss Teréznek, Drotár Eszternek, Németh Péternek, Klébert Szilviának, Szabó Pálnak, Magda Baláznak és Novákné Czégény Zsuzsannának. Anyagi támogatást nyújtottak az alábbi pályázatok: NANOSSEN9 TECH-09-A1-2009-0117, ALMAACID (NFKP_07-A2-2008-0247), NANODRUG 2007ALAP1-00070/2008 (NIH) és CNK-81056 (OTKA).

Hivatkozások

1. Mura, S.; Couvreur, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1394-1416.
2. Terreno, E.; Uggeri, F.; Aime, S. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 328-337.
3. Chen, X.; Gambhir, S. S.; Cheon, J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 841-841.
4. Popova, M. D. et al. *Int. J. Pharm.* **2012**, *436*, 778-785.
5. Cho, Y.; Shi, R.; Borgens, R. B.; Ivanisevic, A. *Nanomed.* **2008**, *3*, 507-519.
6. Lu, J.; Liong, M.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Small* **2007**, *3*, 1341-1346.
7. Huang, I.-P. et al. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 761-769.
8. Kohal, R. J. et al. *Dent. Mater.* **2013**, *29*, 763-776.
9. Hisbergues, M.; Vendeville, S.; Vendeville, P. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2009**, *88*, 519-529.
10. Catauro, M.; Raucci, M.; Ausanio, G. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 531-540.
11. Srinivas N.; Buvaneswari, G. *Trends Biomater. Artif. Organs* **2006**, *20*, 24-30.
12. Tang, S.; Huang, X.; Chen, X.; Zheng, N. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 2442-2447.
13. Kim, J. et al. *Ceram. Int.* **2009**, *35*, 1243-1247.
14. Anderson, J. A.; Fergusson, C. A. *J. Non-Cryst. Solids* **1999**, *246*, 177-188.
15. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. *J. Coll. Interface Sci.* **1968**, *26*, 62-69.
16. Yu, M. et al. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *376*, 67-75.
17. Wacha, A.; Varga, Z.; Bóta, A. *J. Appl. Crystallogr.* **2014**, *47*, 1749-1754.
18. Hartlen, K. D.; Athanasopoulos, A. P. T.; Kitaev, V. *Langmuir* **2008**, *24*, 1714-1720.
19. Pálmai, M. et al. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *390*, 34-40.
20. Pálmai, M. et al. *Bifunctional silica nanoparticles bearing aminopropyl and squaric acid functional groups.* *BioNanoMed* **2012**, Krems, Austria.
21. Pálmai, M. et al. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *445*, 161-165.
22. Heroult, J.; Nischwitz, V.; Bartzak, D.; Goenaga-Infante, H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 3919-3927.
23. Widoniak, J.; Eiden-Assmann, S.; Maret, G. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *15*, 3149-3155.
24. Ghanashyam Krishna, M.; Hartridge, A.; Bhattacharya, A. K. *Int. J. Mod. Phys. B* **2002**, *16*, 4017-4025.
25. Aytimur, A.; Uslu, I.; Koçyiğit, S.; Özcan, F. *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 3851-3856.
26. Azorin, J.; Rivera, T.; Furetta, C.; Sánchez-Rodríguez, A. *Mater. Sci. Forum* **2005**, *480-481*, 145-148.
27. Soares, M. R. N. et al. *J. Appl. Phys.* **2011**, *109*, 013516 (1-5).
28. Zhang, C. et al. *Langmuir* **2009**, *25*, 7078-7083.
29. Naszályi Nagy, L. *J. Mater. Chem. B* **2015**, doi:10.1039/C5TB00832H
30. Greish, K. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2010**, *624*, 25-37.
31. Takahashi, K.; Shibagaki, M.; Matsushita, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1989**, *62*, 2353-2361.
32. Naszályi Nagy, L. et al. Preparation and characterization of silica@zirconia@copolymer nanocarriers *Colloid Polym Sci* **2015**, accepted.
33. Iler, R. K. *The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*, John Wiley & Sons: New York, **1979**.
34. Renger, C. et al. *J. Ceram. Process. Res.* **2006**, *7*, 106-112.
35. Polyák, A. et al. *Int. J. Pharm.* **2013**, *449*, 10-17.
36. Polyák, A. et al. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *42*, S442.
37. Császár, B. et al. *Slow-release nanocarriers for eflornithine anti-cancer drug* **2014** Dechema Workshop on Soft Smart Particles, Frankfurt, Germany Abstr. P17.

Preparation and characterization of inorganic drug nanocarriers

The laboratory of Biological Nanochemistry was founded in 2009 for the preparation and characterization of sensor and drug nanocarriers. In this paper we summarize our results concerning the development of inorganic-based nanocarriers (silica, zirconia and silica@zirconia core@shell particles).

Silica nanoparticles

Multifunctional silica nanoparticles were obtained starting from 20 nm diameter Stöber silica particles (Fig.1 left). An original, "green" synthesis route was elaborated by our group for their aminopropylsilylation.¹⁹ The partial transformation of amino-groups led to a) fluorescein-labelled and amino-bearing bifunctional particles, that showed good uptake in H358 cells; b) amino- and thiol-bearing bifunctional particles (using sulfo-SMCC linker) for further labeling with sensor dye and targeting protein, and c) squaric acid and amino-bearing bifunctional particles that showed good biocompatibility in CellTiterGlo® assay.

Porous drug carrier nanoparticles were obtained by the method of Yu *et al.*¹⁶ (MSN, 85 nm diameter, Fig. 1 center). Their characterization by N₂ adsorption-desorption evidenced that contrary to the literature, these are microporous materials (not mesoporous) with mean pore diameter of 1.6 nm. 1.5 m/m% daunorubicin, 3.5 m/m% ursolic acid (UA), 6.5 m/m% DL- α -difluoromethyl-ornithine (DFMO) and 17.5% doxorubicine (DOX) were encapsulated into their pores.

Metrological standards were prepared and characterized by the method of Hartlen *et al.*¹⁸ (20 nm diameter, Fig.1 right). After elaboration of the total synthesis of isotopically enriched ²⁹Si-TEOS, we also prepared isotopically enriched ²⁹Si-silica particles for further use in FFF-ICP-IDMS analysis technique as internal standards.^{21, 22}

Zirconia particles

Drug carrier zirconia particles with 300-400 nm diameter were prepared in a single step reaction by the method of Widoniak *et al.*²³ (Fig.3). Our experiments carried out for the improvement of the synthesis route showed that these particles were inherently fluorescent and microporous, which has not been described before. 0.65 m/m% DFMO, 1.75 m/m% DOX and 2.6 m/m% UA was encapsulated into the pores. The adsorption of ursolic acid has induced a sufficiently high shift in the isoelectric point of zirconia to obtain stable colloid at physiological pH. ^{99m}Tc isotope labeling was carried out on the stable suspension in phosphate buffer with excellent labeling stability (~99%). A first *in vivo* biodistribution study was performed in a healthy dog showing that colloid stability was maintained during the intravenous administration and circulation.²⁹

Silica@zirconia core@shell nanoparticles

SiO₂@ZrO₂@PMA nanotheranostics

We prepared 100 nm diameter Stöber silica particles and have adapted the method of Kim *et al.*¹³ for their coverage with ZrO₂. A complex polymer shell was thereafter formed at their surface using L-(-)-malic acid, β -cyclodextrin, folic acid and diamino-polyethyleneglycol chains. The diameter of the resulting drug

carrier is nearly 130 nm (Fig.5). Though according to zeta potential – pH curves, the complex nanocarriers should be stable in a wide range of pH, our study revealed that due to zwitterionic structuration, dispersed state can only be obtained at pH over 7. We studied the degradation of the nanocarriers in saline during two weeks' period. Open loop method was used discarding the whole supernatant every day of the study. We observed huge variation of the supernatant composition during the degradation process (Fig. 7). Among the spectral bands of the polymer components we have also detected new bands corresponding to folic acid – zirconium ion complex that has not been described before in the literature. Fourier-transform infrared analysis of the residual particles showed the partial dissolution of silica core, as well. The complex nanocarriers did not show concentration or time dependent toxicity in a CytoToxFluor™ assay carried out on human Jurkat cells (incubation times: 24-48-72 h; concentration 0.025-500 μ g/ml). Radiolabelling with ^{99m}Tc showed excellent *in vitro* and *in vivo* stability. Preliminary biodistribution examinations were performed in tumor bearing rat models. The labelled nanocarrier showed promising tumor accumulation (5-11% of injected dose).³² A spontaneously diseased veterinary patient (cat) was administered the radiolabeled nanosuspension, which has shown good diagnostic potential for the folate overexpressing tumor (see electronic supplementary material).³⁶ By that means, our complex nanocarrier is a potential theranostic tool that can further be filled with various anticancer agents (personalized medicine) without inducing significant change in the physico-chemical properties of the nanocarrier due to the built-in β -cyclodextrin rings.

MSN@ZrO₂@P drug nanocarriers

This time we aimed at the preparation of slow-release nanocarriers for DFMO. The core of the complex nanocarrier has been changed to porous Yu silica for the achievement of high drug content (MSN). A basic hydrothermal treatment was applied to an amount of the original MSN1 to obtain "larger pore size" sample (MSN4) according to the literature.¹⁶ As DFMO has both amine and carboxyl groups we simply co-condensed it with L-(-)-malic acid to obtain a copolymer at the surface of the core@shell particles (PB samples). We also prepared samples adding DFMO to the particles before zirconia deposition (PA samples). TEM pictures showed that the polymeric shell is less uniform for these particles than for SiO₂@ZrO₂@PMA particles. Thermogravimetry (TG) showed 30-40 m/m% polymer at the surface of the inorganic cores. After acidic degradation of the whole polymeric shell, picrylsulfonic acid test was performed on each sample to determine the quantity of encapsulated DFMO (Fig. 9). The hydrothermal treatment seemed not to affect the quantity of encapsulated DFMO for uncovered silica samples, but TG reveals a notable difference in the mode of adsorption (Fig.8 inset). This difference is apparently conserved after deposition of zirconia and preparation of polymeric shell (Fig. 8). The adsorption of methyleneblue on native (MSN1), hydrothermally treated (MSN4) and zirconia-covered analogues evidenced the fouling of pores by zirconia deposition. Interestingly, the same drug content was obtained for PA and PB samples, but an important increase was achieved by the hydrothermal treatment of the core. We assume, that the activation of silica surface took place allowing the deposition of higher zirconia quantity (larger surface), that could act as a more efficient catalyzer in the co-condensation reaction. TG curves prove a significantly higher conversion of the shell of MSN4 compared to those obtained on MSN1 under the same synthetic conditions (MSN1 curves are not shown in Fig. 8). According to our release kinetics experiments, we successfully realized the prolonged release of DFMO (Fig. 10).³⁷